

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出願年月日

Date of Application: 2002年 6月28日

出願番号

Application Number: 特願2002-189283

[ST.10/C]:

[JP2002-189283]

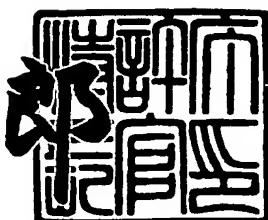
出願人

Applicant(s): 株式会社フジキン

2003年 6月20日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

太田信一



出証番号 出証特2003-3048824

【書類名】 特許願

【整理番号】 02P186WW

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12Q 1/02

【発明者】

【住所又は居所】 静岡県清水市草薙1181-16

【氏名】 小野 信一

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市御幸が丘18番地 株式会社フジキン
筑波研究工場内

【氏名】 平岡 潔

【特許出願人】

【識別番号】 390033857

【氏名又は名称】 株式会社フジキン

【代理人】

【識別番号】 100087745

【弁理士】

【氏名又は名称】 清水 善廣

【選任した代理人】

【識別番号】 100098545

【弁理士】

【氏名又は名称】 阿部 伸一

【選任した代理人】

【識別番号】 100106611

【弁理士】

【氏名又は名称】 辻田 幸史

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 070140

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【物件名】 微生物の受託証（受託番号F E R M P - 1 8 9 0 9）の
写し 1

【提出物件の特記事項】 手続補足書により提出する。

【物件名】 微生物の受託証（受託番号F E R M P - 1 8 9 1 0）の
写し 1

【提出物件の特記事項】 手続補足書により提出する。

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 細胞毒性試験方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 チョウザメ由来の株化細胞に対する毒性に基づいて被検物質の毒性評価を行う細胞毒性試験方法。

【請求項2】 ベステル由来の株化細胞を用いる請求項1記載の細胞毒性試験方法。

【請求項3】 上皮細胞由来の株化細胞を用いる請求項1記載の細胞毒性試験方法。

【請求項4】 眼球上皮細胞由来の株化細胞を用いる請求項3記載の細胞毒性試験方法。

【請求項5】 虹彩色素上皮細胞由来の株化細胞を用いる請求項4記載の細胞毒性試験方法。

【請求項6】 細胞外基質を添加することなしに継代培養が可能な株化細胞を用いる請求項1乃至5のいずれかに記載の細胞毒性試験方法。

【請求項7】 50回以上の継代培養が可能な株化細胞を用いる請求項1乃至6のいずれかに記載の細胞毒性試験方法。

【請求項8】 20℃での培養開始後2日目～6日目のダブリングタイムが50時間未満である株化細胞を用いる請求項1乃至7のいずれかに記載の細胞毒性試験方法。

【請求項9】 培養皿に添加してから接着するまでの着定率が1時間後に75%以上である株化細胞を用いる請求項1乃至8のいずれかに記載の細胞毒性試験方法。

【請求項10】 チョウザメ眼球由来の株化細胞であるSTIP-1細胞(ERM P-18909)を用いる細胞毒性試験方法。

【請求項11】 チョウザメ眼球由来の株化細胞であるSTIP-3細胞(ERM P-18910)を用いる細胞毒性試験方法。

【請求項12】 被検物質の毒性評価にアラマーブルーアッセイ法を用いる請求項1乃至11のいずれかに記載の細胞毒性試験方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、化学物質や重金属などの各種の被検物質の細胞毒性試験方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

これまで、化学物質や重金属（亜鉛、カドミウム、銅、砒素、コバルト、モリブデン、ニッケル、鉛、セレン、クロム、錫、水銀など）などの各種の被検物質の毒性試験は動物個体を用いて行われてきたが、動物個体を用いた方法は、時間と費用がかかり過ぎるという問題だけでなく、動物愛護の観点からも問題がある。従って、近年、株化細胞（培養細胞）を用いた毒性試験方法、即ち、細胞毒性試験方法が検討されている。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】

水環境における被検物質の毒性試験は魚類由来の株化細胞を用いて行うことが望ましく、ニジマス卵巣由来の線維芽性株化細胞であるRTG-2細胞やファットヘッドミノー由来の上皮性株化細胞であるFHM細胞などを用いた毒性試験方法が既に検討されている。しかしながら、これらの方法は感受性などの面において十分なものではなく、また、RTG-2細胞は、増殖速度が遅いといった問題や、増殖温度範囲が狭いといった問題があり、利便性の面においても必ずしも満足できるものではない。

そこで本発明は、新規な魚類株化細胞を用いた細胞毒性試験方法を提供することを目的とする。

【0004】

【課題を解決するための手段】

上記の点に鑑みてなされた本発明は、チョウザメ由来の株化細胞に対する毒性に基づいて被検物質の毒性評価を行う細胞毒性試験方法である。

また、請求項2記載の細胞毒性試験方法は、ベステル由来の株化細胞を用いる

ものである。

また、請求項3記載の細胞毒性試験方法は、上皮細胞由来の株化細胞を用いるものである。

また、請求項4記載の細胞毒性試験方法は、眼球上皮細胞由来の株化細胞を用いるものである。

また、請求項5記載の細胞毒性試験方法は、虹彩色素上皮細胞由来の株化細胞を用いるものである。

また、請求項6記載の細胞毒性試験方法は、細胞外基質を添加することなしに継代培養が可能な株化細胞を用いるものである。

また、請求項7記載の細胞毒性試験方法は、50回以上の継代培養が可能な株化細胞を用いるものである。

また、請求項8記載の細胞毒性試験方法は、20℃での培養開始後2日目～6日目のダブリングタイムが50時間未満である株化細胞を用いるものである。

また、請求項9記載の細胞毒性試験方法は、培養皿に添加してから接着するまでの着定率が1時間後に75%以上である株化細胞を用いるものである。

また、請求項10記載の細胞毒性試験方法は、チョウザメ眼球由来の株化細胞であるSTIP-1細胞(FERM P-18909)を用いるものである。

また、請求項11記載の細胞毒性試験方法は、チョウザメ眼球由来の株化細胞であるSTIP-3細胞(FERM P-18910)を用いるものである。

また、請求項12記載の細胞毒性試験方法は、被検物質の毒性評価にアラマーブルーアッセイ法を用いるものである。

【0005】

【発明の実施の形態】

本発明の細胞毒性試験方法においては、被検物質の毒性評価を行うためにチョウザメ由来の株化細胞を用いる。チョウザメ(sturgeon)としては、例えば、*Huso*属や*Acipenser*属に属するものが挙げられるが、好適には*Huso*属に属するベルーガ(*H. Huso*)の雌と*Acipenser*属に属するステールリヤチ(*A. ruthenus*)の雄から作出された品種改良種であるベステル(Bester)が挙げられる。ベステルは交雑種であるため、

ベステル由来の株化細胞は、各種の被検物質に対する感受性に関して H u s o 属 チョウザメの細胞と A c i p e n s e r 属 チョウザメの細胞の双方の特性を兼ね備えていることが期待されるからである。

【0006】

チョウザメ由来の株化細胞は、例えば、上皮細胞から樹立される。当該上皮細胞は、チョウザメのどの部位の組織のものであってもよいが、眼球のいずれかの組織の上皮細胞であることが望ましく、好適な上皮細胞としては、外界と非接触の状態で存在する虹彩色素上皮細胞や網膜色素上皮細胞などが挙げられる。これらの細胞は元来、微生物汚染の可能性がないので、無菌的に細胞を取出せば、その後の作業を無菌的に行うことで株化細胞の微生物汚染を確実に防ぐことができるからである。なお、株化細胞は、腎臓や卵巣を由来とする上皮細胞から樹立されたものであってもよいが、この場合、株化細胞を樹立するに当たっては、これらの組織から上皮細胞のみを選択して分離培養するためにはある程度の時間と労力を必要とするといった点や、微生物汚染の可能性が否定できないといった点を認識しておく必要がある。

【0007】

株化細胞の樹立方法は、公知の方法に従って、初代培養細胞を継代培養することで行えばよい。培地は、魚類細胞の培養に通常用いられる L 1 5 培地に牛胎児血清 (F B S) を加えたようなものでよい。

【0008】

チョウザメ由来の株化細胞として好適なものは、例えば、ベステル眼球の虹彩色素上皮細胞由来の株化細胞である S T I P - 1 細胞 (F E R M P - 1 8 9 0 9) と S T I P - 3 細胞 (F E R M P - 1 8 9 1 0) が挙げられる。いずれの細胞も、 R T G - 2 細胞や F H M 細胞などよりも感受性が高いという利点を有する。また、いずれの細胞も、細胞外基質を添加することなしに継代培養が可能であること、 50 回以上の継代培養が可能であることから、利便性の面において優れている。とりわけ、 S T I P - 1 細胞は、 20 °C での培養開始後 2 日目～ 6 日目のダブルリングタイムが 50 時間未満であるといった特性や、培養皿に添加してから接着するまでの着定率が 1 時間後に 75 % 以上であるといった特性を有する

ので、一度に大量の試験区を設定しても簡便かつ迅速に試験を行うことができる

【0009】

被検物質のチョウザメ由来の株化細胞に対する毒性は、例えば、アラマーブルーアッセイ法を用いて評価すればよい。

アラマーブルーアッセイ法は、動物細胞などの細胞代謝を測定するために開発されたバイオアッセイ法の一つである。アラマーブルーは、その還元に細胞への取込みを必要とする酸化還元色素であり、ミトコンドリア内で行われている呼吸代謝系の還元反応により、酸化型（無蛍光・青）から還元型（蛍光・赤）に変化する性質を持つ。細胞代謝が正常であると還元反応が進行する一方、細胞代謝に異常をきたすと酸化型のままであるので、色の変化を測定して細胞代謝の異常を調べることができる。また、細胞代謝の測定を蛍光や吸光に基づいて行ってもよい。この場合、蛍光は530 nm～560 nmの励起波長と590 nmの検出波長でモニターされ、吸光は570 nmと600 nmでモニターされる。

アラマーブルーアッセイ法は、アラマーブルーが水溶性であり、ニュートラルレッドなどの他の色素を用いたバイオアッセイ法において必要とされる抽出操作や固定操作が不要なため、評価を簡便に行うことができるという点において望ましいものである。

なお、このアラマーブルーアッセイ法は、例えば、市販のキット（B I O S O U R C E 社製）を用いて行うことができる。

【0010】

【実施例】

以下に参考例と実施例を挙げ、本発明を具体的に説明する。

【0011】

参考例：チョウザメ由来の株化細胞の樹立

1. ベステル眼球からの虹彩色素上皮細胞の分離

体長約15 cmのベステル30尾から眼球を摘出して70%エタノール中で殺菌処理した後、殺菌処理した眼球をペニシリンとストレプトマイシンを添加したP B S (-) 中でよく洗浄した。その後、眼球から角膜とレンズを取り除いて虹

彩を切り出した。こうして得られた虹彩を0.05%EDTAで約40分間処理し、虹彩色素上皮細胞と、虹彩のストローマや強膜などの結合組織との分離を容易にした後、これらの結合組織を取り除き、分離したシート状の虹彩色素上皮細胞を0.125%トリプシンで酵素処理してシングルセル状態の細胞（初代細胞）を得た。

【0012】

2. 初代培養

上記のようにして得られた初代細胞を、直径3.5cmプラスチックディッシュ（培養皿）に加えた、Leibovit's L15培地（Gibco社製）に10%FBS（Gibco社製の牛胎児血清）とペニシリソ（10unit/ml）とストレプトマイシン（50μg/ml）を添加した培地を用い、20℃のCO₂インキュベータ内（但し大気雰囲気）で培養した。初代細胞の中から増殖性の優れた細胞を選択し、継代培養を繰り返した。

【0013】

3. 継代培養

培養皿が細胞で集密的（confluent）な状態になったら、0.05%EDTAと0.125%トリプシンを含有する溶液で細胞を培養皿から剥離し遠心分離により細胞を回収し、別の培養皿に移し、上記の培地を用いて培養を継続した。これを繰り返すことによって、長期間培養可能な2種類の株化細胞（STIP-1細胞とSTIP-3細胞）を得た。いずれの株化細胞も、継代培養の際、コラーゲンなどの細胞外基質を培養皿底面にコーティングするといったような添加をしなくても培養皿に着定した。なお、上記の2種類の株化細胞は独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに寄託されており、それらの受託番号は、STIP-1細胞がFERM P-18909、STIP-3細胞がFERM P-18910である。この特許出願の時点において、株化細胞STIP-1の継代培養回数は140回を超え、株化細胞STIP-3の継代培養回数は80回を超える。

【0014】

4. STIP-1細胞とSTIP-3細胞の特性

(細胞の形態)

S T I P - 1 細胞は細長い細胞であるが上皮性の細胞であった（図1参照：培養開始後8日目の倍率100倍の顕微鏡写真）。一方、S T I P - 3 細胞は典型的な敷石状の上皮性の細胞であった（図2参照：培養開始後14日目の倍率100倍の顕微鏡写真）。

【0015】

(細胞の温度特性)

図3に示したように、S T I P - 1 細胞は15°C～32°Cの広い温度範囲で良好な増殖性を示し、特に20°Cでの増殖性が優れていた。20°Cでの培養開始後2日目～6日目の細胞のダブリングタイム（指數関数的に細胞が増殖する時間）は38.9時間であり、R T G - 2 細胞と比較して約2倍の増殖速度を有していた。一方、図4に示したように、S T I P - 3 細胞は15°C～20°Cで良好な増殖性を示したが、30度以上ではその増殖性は阻害された。20°Cでの培養開始後2日目～6日目の細胞のダブリングタイムは74.9時間であった。

【0016】

(細胞増殖に対するF B Sの影響)

図5に示したように、S T I P - 1 細胞を増殖せしめるために必要なL15培地に添加されるF B Sの濃度は4%で足りた。また、図6に示したように、S T I P - 3 細胞を増殖せしめるために必要なL15培地に添加されるF B Sの濃度も4%で足りた。よって、これらの株化細胞を増殖せしめるために必要なF B Sは少量であることから、これらの株化細胞の大量培養は経済的に有利であることがわかった。

【0017】

(細胞の染色体数)

S T I P - 1 細胞とS T I P - 3 細胞の染色体数を、継代培養80回目の細胞について、培養6日目の対数増殖期の細胞にコルヒチン処理を行う常法にて調べた。具体的には、細胞に最終濃度が0.20 μg/m1になるようにコルヒチンを加え、18時間培養した後に培地を取り除いてから細胞をP B S (-) で洗浄した。次に、0.05%EDTAと0.125%トリプシンを含有する溶液で細

胞を培養皿から剥離し遠心分離により細胞を回収した。こうして回収した細胞に0.075MのKC1を添加して室温にて20分間静置して低張処理を行った。低張処理した細胞懸濁液はカルノア液を用いて20分間氷中で固定した後、フレームドライ法によって染色体標本とした。これをギムザ染色し、顕微鏡（倍率1000倍）で染色体を計数した。その結果、STIP-1細胞の染色体数は $2n = 166 \pm 7.6$ 本、STIP-3細胞の染色体数は $2n = 121 \pm 6.1$ 本となり、いずれの細胞もベステルの染色体数である $2n = 117$ 本と比較して増加していた（図7参照）。この結果は、いずれの細胞も株化細胞であることを特徴付けるものである。染色体を分類すると、いずれの細胞も基本的には2倍体であるが、ランダムに異数性を示していた。 $2n = 173$ 本のSTIP-1細胞の一例の染色体標本を図8に、 $2n = 126$ 本のSTIP-3細胞の一例の染色体標本を図9に示す。

【0018】

(細胞の接着性)

STIP-1細胞の培養皿への接着性を、細胞を培養皿に添加してから接着するまでの時間（着定率：Plating Efficiency：一定時間後に培養皿に定着した細胞数を細胞皿に添加した全細胞数で割った値を百分率で表したもの）により調べた。結果を図10に示す。図10から明らかなように、STIP-1細胞は細胞を培養皿に添加してから5分後には51.4%の着定率を示し、1時間後には83.5%、24時間後には94.8%と極めて高い数値を示した。

【0019】

実施例：STIP-1細胞とSTIP-3細胞を用いた重金属の細胞毒性試験

STIP-1細胞とSTIP-3細胞に対するカドミウムの毒性評価を以下のようにして行った。

【0020】

1. 方法

細胞を96穴マイクロプレート内で集密的（confluent）な状態になるまで20°CのCO₂インキュベータ内（但し大気雰囲気）で培養した。培養は

Leibovit's L15 培地 (Gibco 社製) に 10% FBS (Gibco 社製の牛胎児血清) とペニシリン (10 unit/ml) とストレプトマイシン (50 μg/ml) を添加した培地を用いて行った。

被検物質 (塩化カドミウム: CdCl₂ · 2H₂O) の 0. 2M 水溶液を作成し、0. 2 μm のフィルタで濾過滅菌してから 4°C で保存した。

このカドミウム水溶液から 0. 01 mM, 0. 025 mM, 0. 05 mM, 0. 075 mM, 0. 1 mM, 0. 25 mM, 0. 5 mM, 0. 75 mM, 1 mM の 9 段階の濃度のカドミウム水溶液を作成し、各ウェルに接種した。コントロールには培地のみを加えた。24 時間経過後、アラマーブルー色素を加えてさらに 24 時間培養を続けた。

次に、マイクロプレートリーダーを用いて 2 波長 (570 nm と 600 nm) で各ウェルの吸光度を測定した。カドミウム水溶液による細胞代謝の阻害値は、培地のみ加えたウェルをコントロールとして、カドミウム水溶液を接種したウェル (サンプル) のコントロールに対する減少率として求めた。計算式は以下に示す通りである。

【0021】

【数1】

$$\text{阻害値(%)} = 100 - \frac{\text{サンプル(A570nm-A600nm)} - \text{ブランク(A570nm-A600nm)}}{\text{コントロール(A570nm-A600nm)} - \text{ブランク(A570nm-A600nm)}} \times 100$$

【0022】

以上 の方法によって、50% の細胞に影響が認められる毒性濃度 EC₅₀ 値でもって STIP-1 細胞と STIP-3 細胞に対するカドミウムの毒性評価を行った。

【0023】

2. 結果

STIP-1 細胞に対するカドミウムの EC₅₀ 値は 0. 089 mM であり、STIP-3 細胞に対するカドミウムの EC₅₀ 値は 0. 1 mM であった (図 1 参照)。

照)。このEC₅₀値は、RTG-2細胞を用いた場合やFHM細胞を用いた場合のEC₅₀値である0.18mM~0.38mMよりも低く、STIP-1細胞とSTIP-3細胞は、RTG-2細胞やFHM細胞よりも感受性が高いことがわかった。

【0024】

【発明の効果】

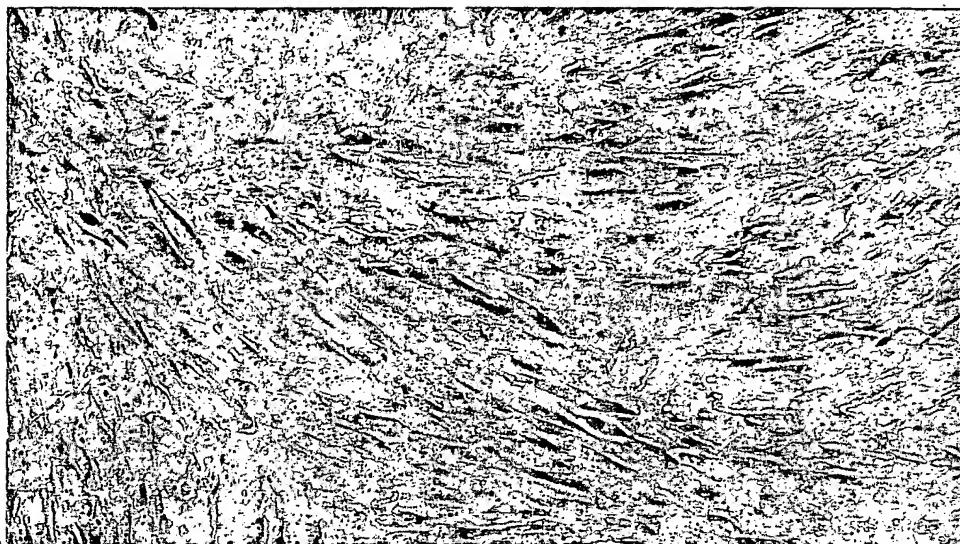
本発明によれば、新規な魚類株化細胞、即ち、チョウザメ由来の株化細胞を用いた細胞毒性試験方法が提供される。

【図面の簡単な説明】

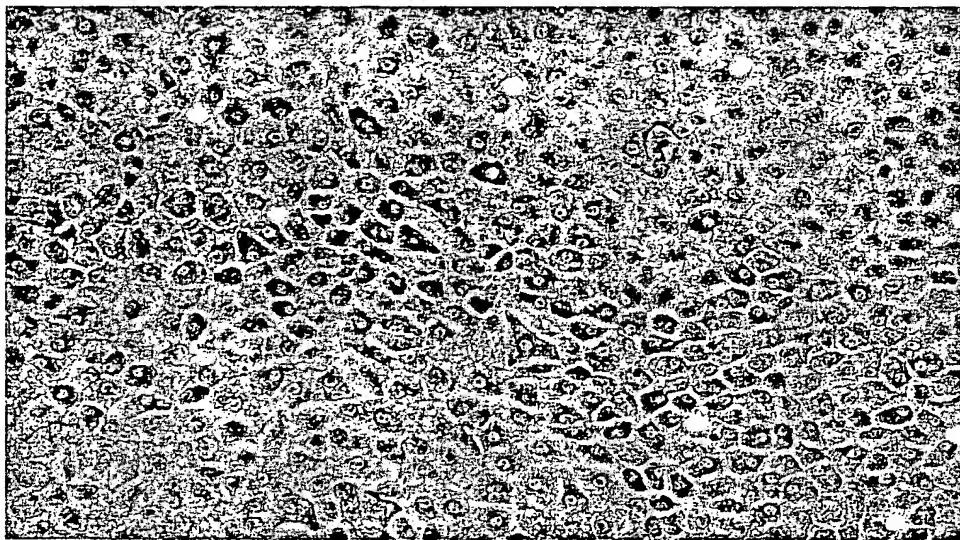
- 【図1】 STIP-1細胞の顕微鏡写真。
- 【図2】 STIP-3細胞の顕微鏡写真。
- 【図3】 各温度におけるSTIP-1細胞の増殖曲線。
- 【図4】 各温度におけるSTIP-3細胞の増殖曲線。
- 【図5】 STIP-1細胞の増殖に対するFBSの影響を示すグラフ。
- 【図6】 STIP-3細胞の増殖に対するFBSの影響を示すグラフ。
- 【図7】 STIP-1細胞とSTIP-3細胞の染色体数を示すグラフ。
- 【図8】 STIP-1細胞の染色体標本。
- 【図9】 STIP-3細胞の染色体標本。
- 【図10】 STIP-1細胞の培養皿への接着性を示すグラフ。
- 【図11】 STIP-1細胞とSTIP-3細胞に対するカドミウムの毒性を示すグラフ。

【書類名】 図面

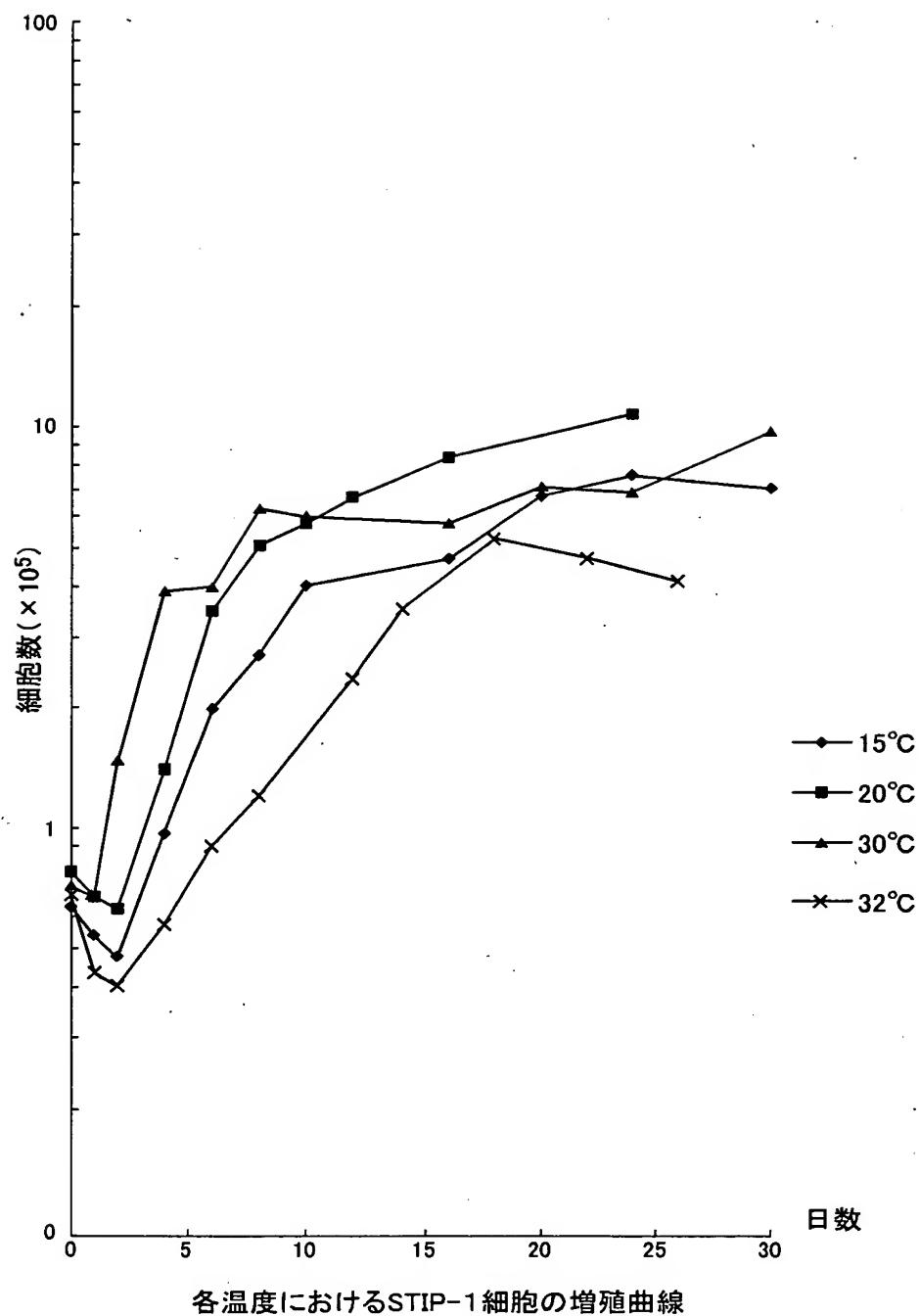
【図1】



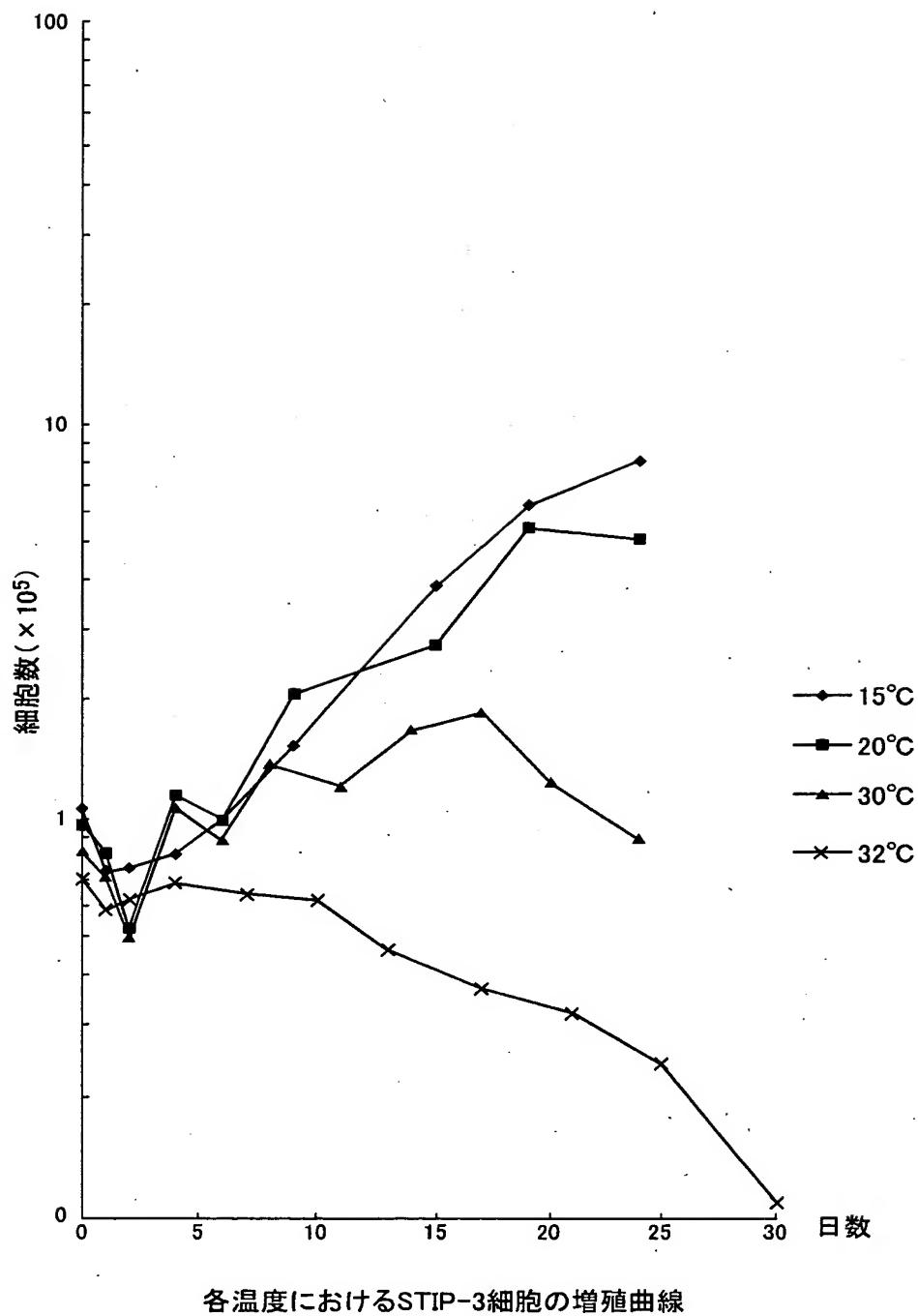
【図2】



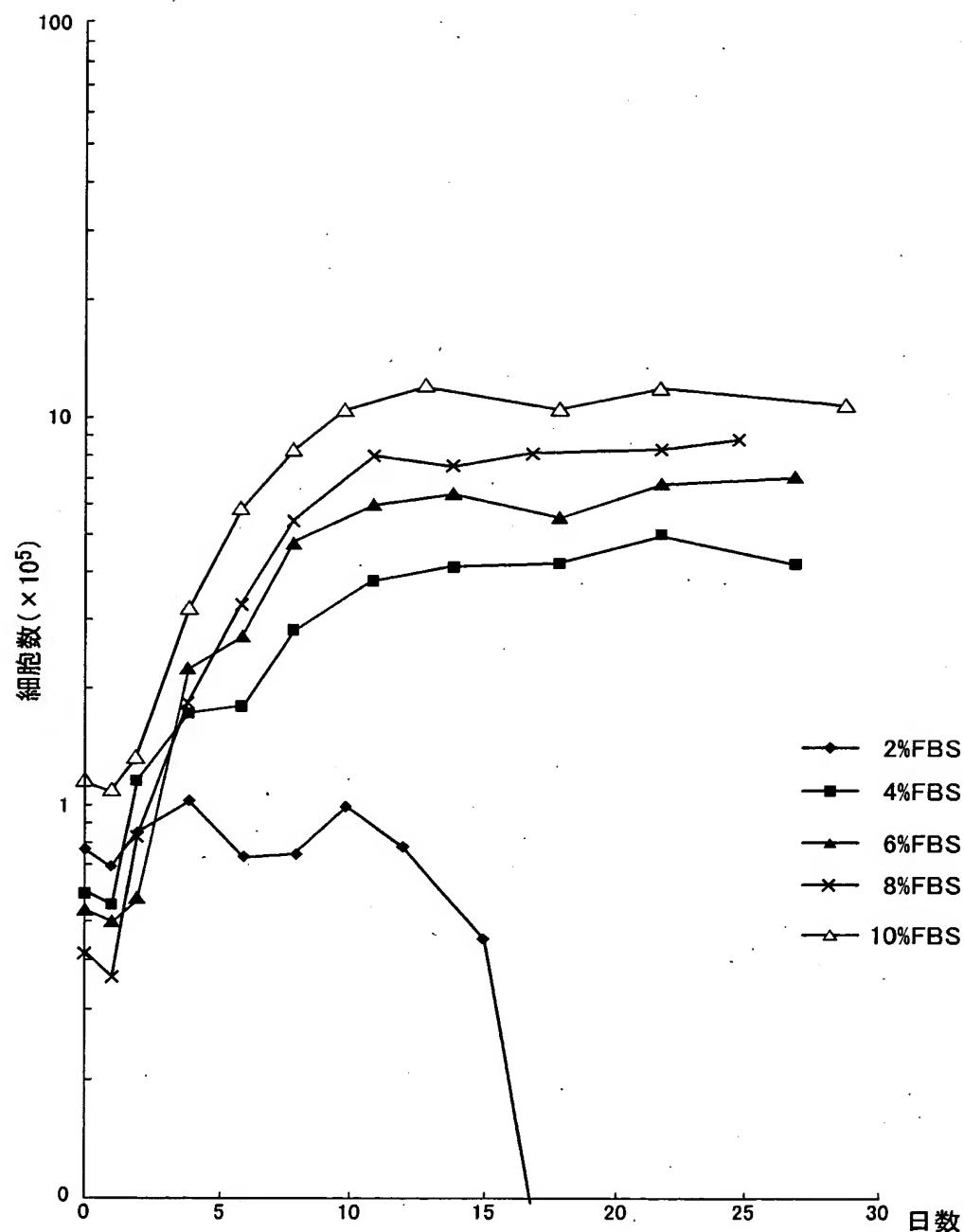
【図3】



【図4】

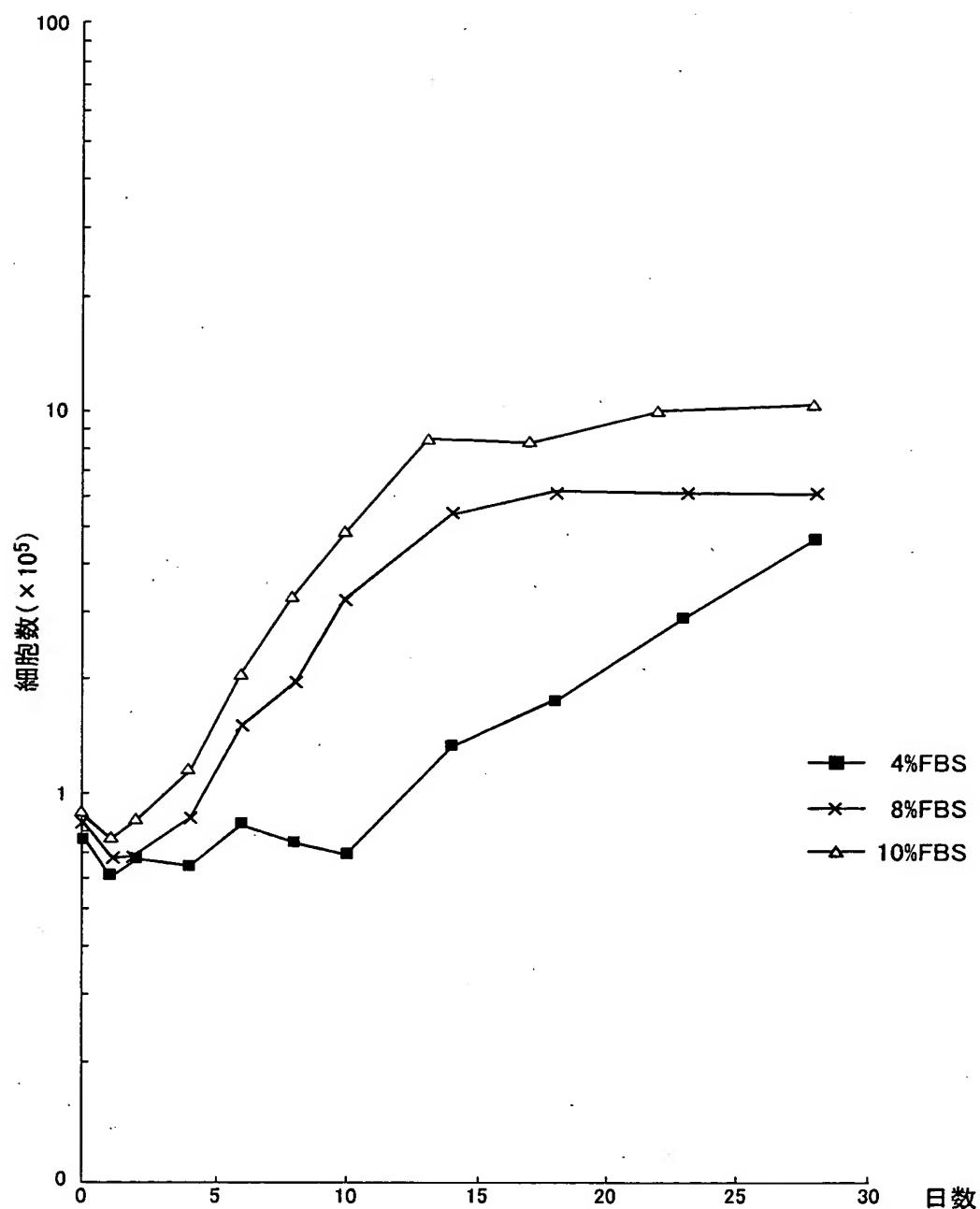


【図5】



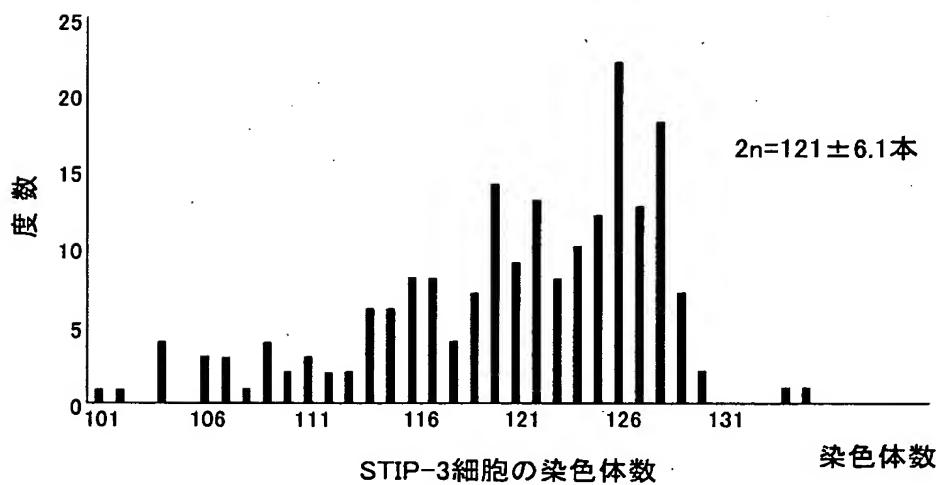
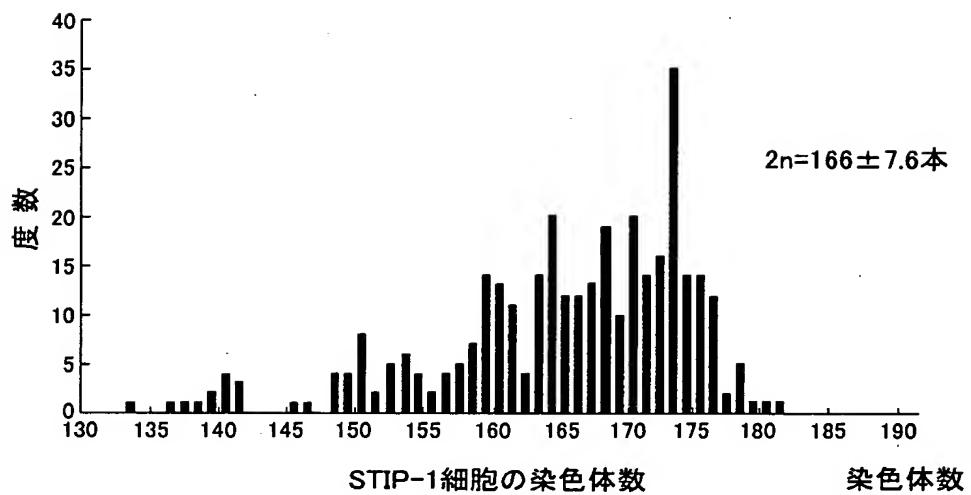
L-15培地に添加した牛胎児血清(FBS)がSTIP-1細胞の増殖に与える影響

【図6】

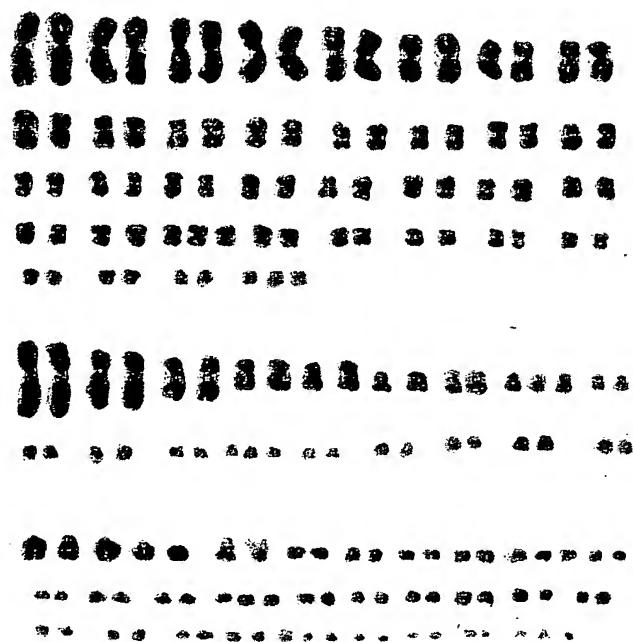


L-15培地に添加した牛胎児血清(FBS)がSTIP-3細胞の増殖に与える影響

【図7】

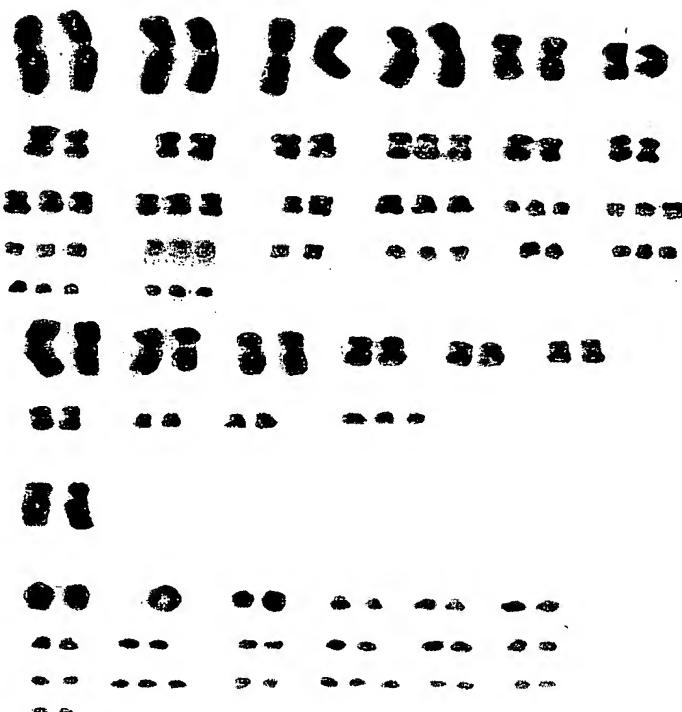


【図8】



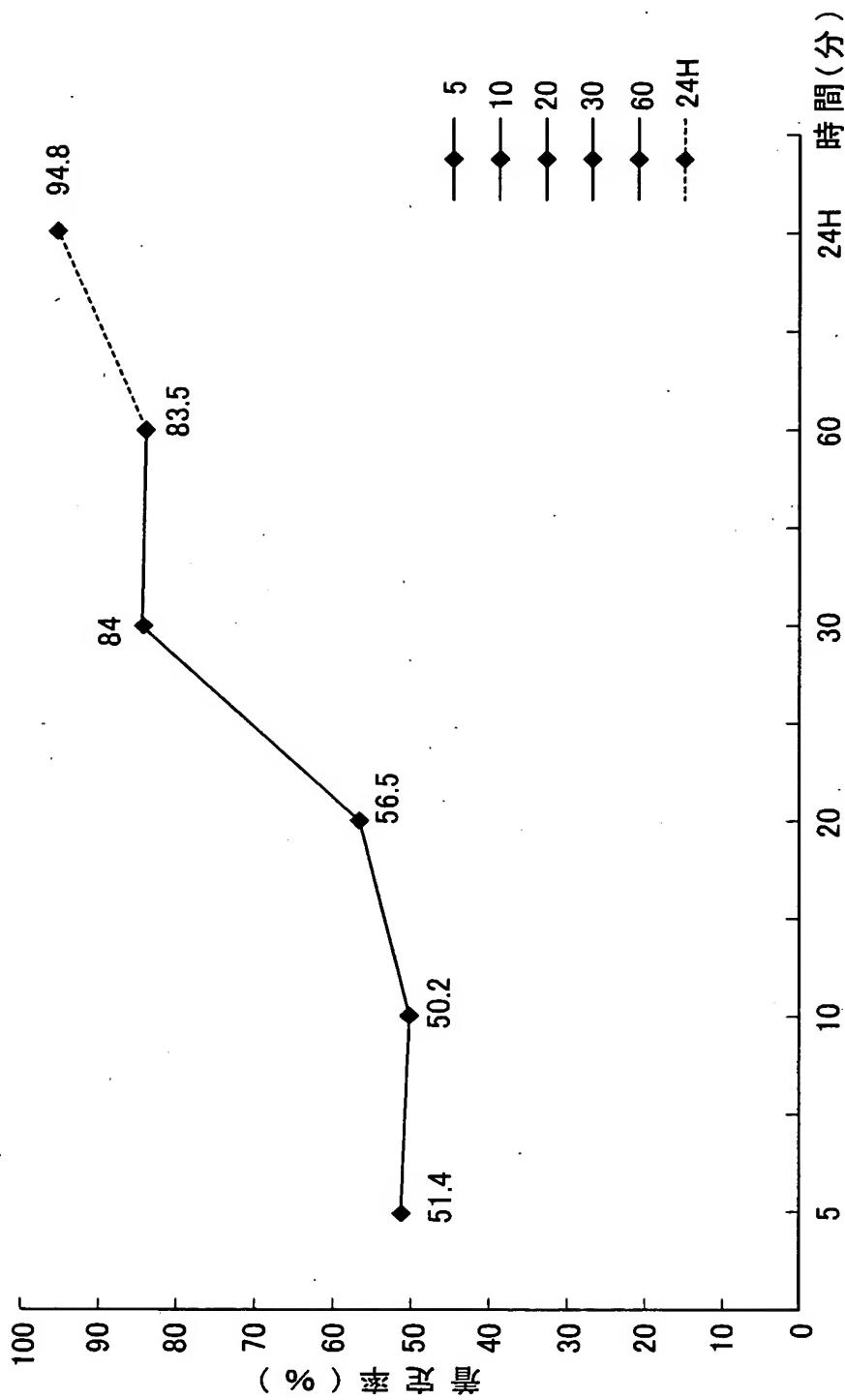
STIP-1細胞から作出了した染色体標本($2n=173$)。
中部動原体型(M型)74本、次中部動原体型(SM型)38本、
次端部型(ST型)0本、末端動原体型61本

【図9】



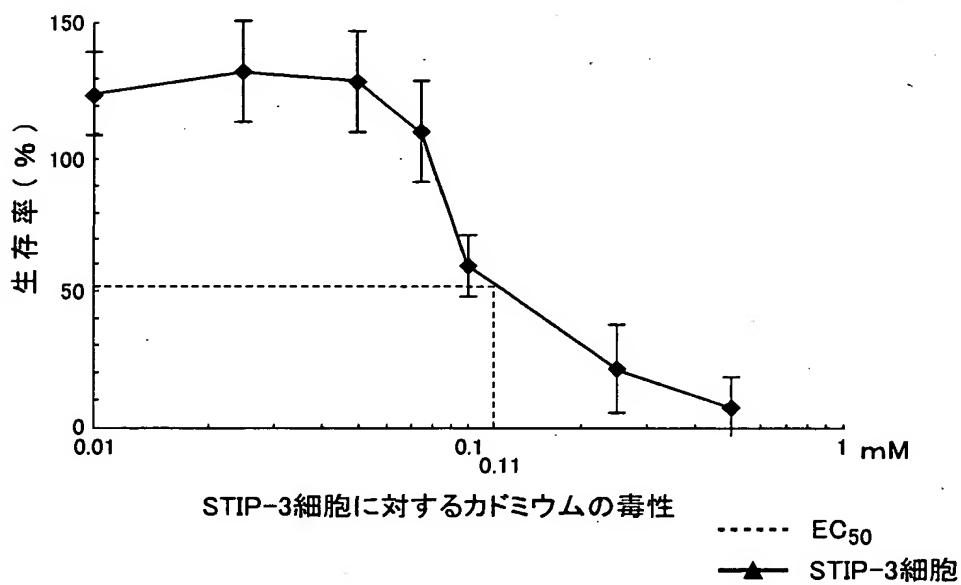
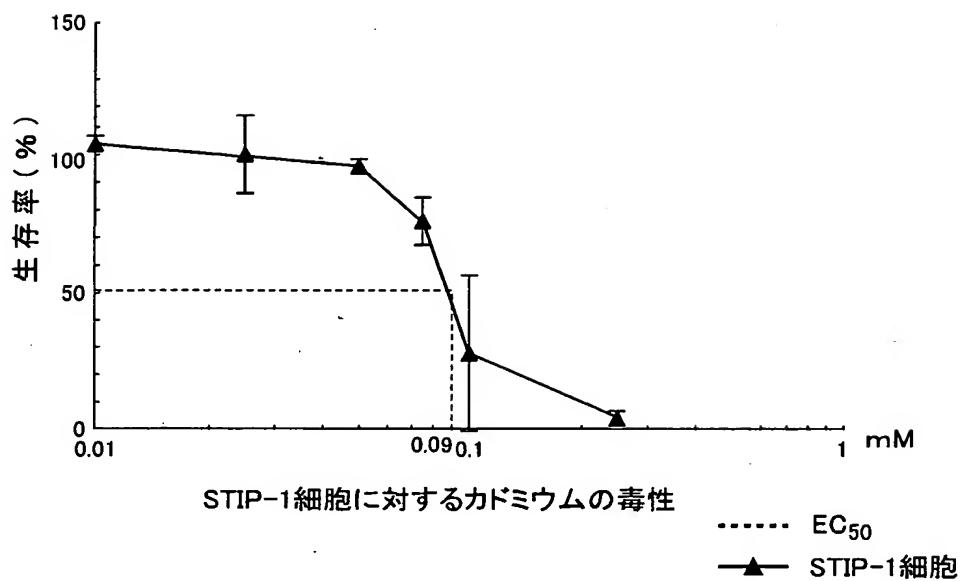
STIP-3細胞から作出了した染色体標本($2n=126$)。
中部動原体型(M型)64本、次中部動原体型(SM型)21本、
次端部型(ST型)2本、末端動原体型39本

【図10】



時間の経過によるSTIP-1細胞の着定率

【図11】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 新規な魚類株化細胞を用いた細胞毒性試験方法を提供すること。

【解決手段】 本発明は、チョウザメ由来の株化細胞に対する毒性に基づいて被検物質の毒性評価を行う細胞毒性試験方法であり、好適なチョウザメ由来の株化細胞としては、S T I P - 1 細胞 (F E R M P - 1 8 9 0 9) と S T I P - 3 細胞 (F E R M P - 1 8 9 1 0) が挙げられる。

【選択図】 図11

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2002-189283
受付番号	50200948961
書類名	特許願
担当官	森吉 美智枝 7577
作成日	平成14年 7月 1日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成14年 6月28日
【特許出願人】	
【識別番号】	390033857
【住所又は居所】	大阪府大阪市西区立売堀2丁目3番2号
【氏名又は名称】	株式会社フジキン
【代理人】	申請人
【識別番号】	100087745
【住所又は居所】	東京都新宿区高田馬場2丁目14番4号 八城ビル3階
【氏名又は名称】	清水 善▲廣▼
【選任した代理人】	
【識別番号】	100098545
【住所又は居所】	東京都新宿区高田馬場2丁目14番4号 八城ビル3階
【氏名又は名称】	阿部 伸一
【選任した代理人】	
【識別番号】	100106611
【住所又は居所】	東京都新宿区高田馬場2丁目14番4号 八城ビル3階
【氏名又は名称】	辻田 幸史

次頁無

出願人履歴情報

識別番号 [390033857]

1. 変更年月日 1990年11月30日

[変更理由] 新規登録

住 所 大阪府大阪市西区立売堀2丁目3番2号

氏 名 株式会社フジキン